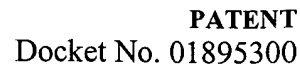


1651



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re U.S. Patent Application of:

Zouboulis, Christos

Serial No.: 09/920,392

Filed: August 1, 2001

For: Sebocytes, Sebocyte-cell line and
uses thereof

[illegible]

Examiner: L. Lankford, Jr.

Group Art Unit: 1651

CERTIFICATE OF MAILING BY "EXPRESS
MAIL", mailing label number
EV113373998US

Date of Deposit: April 25, 2003

I hereby certify that this paper or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Assistant Commissioner of Patents, Washington, DC 20231

Timothy M. Hubalik

(typed or printed name of person mailing paper or fee)

(signature of person mailing paper or fee)

RECEIVED

APR 29 2003

TRANSMITTAL LETTER

Assistant Commissioner of Patents
BOX: RESPONSE NO FEE
Washington, D.C. 20231

TECH CENTER 1600/2900

Dear Sir:

In response to the Examiner's Office Action Summary of September 12, 2002, advising that the Office has not received the certified copies of the foreign priority documents, Applicant submits herewith, a certified copy of the PCT priority patent application PCT/EP99/09988.

The Commissioner is authorized to charge our deposit account 130019 for any fees which might be associated with this filing.

Respectfully submitted,

Dated: April 25, 2003

By: 

Thomas R. Stiebel, Jr.
Reg. No. 48,682

MAYER, BROWN, ROWE & MAW
P.O. Box 2828
Chicago, Illinois 60690-2828
(312) 701-8775



Europäisches
Patentamt

European Patent
Office

Office européen
des brevets

RECEIVED

APR 29 2003

TECH CENTER 1600/2900



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den
The Hague,
La Haye, le

26. 03. 2003

Der Präsident des Europäischen Patentamts
Im Auftrag
For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

Sabine Aulbers

Patentanmeldung Nr.
Patent application n°
Demande de brevet n°

PCT/EP 99/09988

**Blatt 2 der Beschreibung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation**



Anmeldung Nr.: PCT/EP 99/09988
Application no.:
Demande n°:
Anmelder: 1. ZOUBOULIS, Christos - Berlin, Deutschland
Applicant(s):
Demandeur(s):

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention: SEBOZYTEN, SEBOZYTEN-ZELLINIE UND DEREN VERWENDUNGEN
Titre de l'invention:

Anmeldetag: 15. Dezember 1999 (15.12.1999)
Date of filing:
Date de dépôt:

In Anspruch genommene Priorität(en)
Priority(ies) claimed
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat: Deutschland	Tag: 01. Februar 1999	Aktenzeichen: 19903920.8
State:	Date: (01.02.1999)	File no.
Pays:	Date:	Numéro de dépôt:

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

PCT-ANTRAG

WO 25933

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.12.1999 02:55:02 PM

IV-2	Weitere(r) Anwälte/Anwalt	weitere(r) Anwalt/Anwälte mit derselben Anschrift wie erstgenannter Anwalt TIEDTKE, Harro; BÜHLING, Gerhard; KINNE, Reinhard; KLAUS, Grams; VOLLNHALS, Aurel; LESON, Thomas, Johannes Alois; CHIVAROV, Georgi; GRILL, Matthias; TRÖSCH, Hans-Ludwig; KÜHN, Alexander; OSER, Anderas; BÖCKELEN, Rainer; UNGERER, Olaf; FELDMEIER, Jürgen; KLINGELE, Stefan; BÜHLING, Stefan
IV-2-1	Name(n)	
V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 and V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.	
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE

SEBOZYTEN, SEBOZYTEN-ZELLINIE UND DEREN VERWENDUNGEN**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft fetthaltige und talgproduzierende Zellen der Haut und Schleimhaut, auch
5 Sebozyten genannt. Insbesondere betrifft sie Talgdrüsenzellen und eine Talgdrüsenzelllinie mit der Eigenschaft, über viele Subkulturen hinweg weitergezüchtet werden zu können.- Die Sebozyten eignen sich hervorragend für nützliche Anwendungen, beispielsweise zur Untersuchung der Physiologie und
10 Pathophysiologie der menschlichen oder der tierischen Talgdrüse, zur Untersuchung der Entstehung der Akne, der Seborrhoe bzw. anderer Erkrankungen, zum Testen der Wirkung verschiedener Substanzen und von Medikamenten, zur Entwicklung von Zellkultursystemen aus zweidimensionalen oder dreidimensionalen
15 Zellansammlungen und Konstruktionen organähnlicher Strukturen, und zur Herstellung von Produkten, die von diesen Zellen stammen.

Zunehmende Anzeichen sprechen dafür, daß die Sebozyten eine
20 kritische Rolle in pathophysiologischen Prozessen und in Krankheiten des Talgdrüsen-Haar-Apparates, insbesondere bei der Akne (Gollnick et al. J. Dermatol. 1991;18:489-499; Brown und Shalita. Lancet 1998;351:1871-1876; Cunliffe. Dermatology 1998;196:9-15; Strauss. Dermatology 1998;196:182-184) spielen.
25 Ein Großteil unseres Verständnisses der Physiologie und Pathophysiologie der Talgdrüse stammen aus experimentellen Tiermodellen (Pochi, in Models in Dermatology, Vol. 2, N. Lowe and H. Maibach, editors, Basel, 1985;70-75). Es wurde aber gefunden, daß Tiermodelle keine vernünftigen Voraussagen zur
30 Beurteilung der Wirkungen von Anti-Akne-Medikamenten beim Menschen zuließen (Geiger. Dermatology 1995;191:305-310). Die Tatsache, daß Akne lediglich beim Menschen auftritt und daß die sekretorische Aktivität der Talgdrüse stark speziensspezifisch ist (Nikkari. J. Invest. Dermatol. 1974;257-267), führte zu der
35 Suche nach menschlichen Modellen. Anfängliche Studien zur Beseitigung dieser Nachteile erfolgten anhand von menschlichen

Hautproben, die man entweder in-vitro inkubierte (Hsia et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1970;135:285-291; Cooper et al. Br. J. Dermatol. 1976;94:165-172; Sharp et al. J. Endocrinol. 1976;70:491-499) oder auf Nacktmäusen transplantierte (Petersen et al. J. Clin. Invest. 1984;74:1358-1365). Grundlegende Studien
5 über die Aktivität menschlicher Sebozyten sowie deren Regulierung waren jedoch erst in dem vergangenen Jahrzehnt möglich, als lebensfähige menschliche Talgdrüsen isoliert wurden (Kealey et al. Br. J. Dermatol. 1986;114:181-188) und das
10 Kulturmodell menschlicher Sebozyten in vitro etabliert werden konnte (Xia et al. J. Invest. Dermatol. 1989;93:315-321).

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden durch Modifikationen der Kulturtechnik von Xia et al. (1989) Verbesserungen hinsichtlich
15 der Reproduzierbarkeit der Kultivierung menschlicher Sebozyten in vitro erzielt. So verzichteten Zouboulis et al. (Skin. Pharmacol. 1991;4:74-83) durch die Zugabe menschlichen Serums auf Hydrokortison im Kulturmedium. Lee (in Epithelia: Advances in Cell Physiology and Cell Culture; C.J. Jones, editors:
20 Kluwer, Dordrecht, 1990;333-350) behandelte Talgdrüsen mit Kollagenase, bevor sie sie in serumfreiem Medium, welches mit Zusatzstoffen angereichert war, kultivierte. Ebenso konnten primäre Sebozytenkulturen erhalten werden, indem die 3T3-Fibroblastenschicht, die als Haftungsboden dient, weggelassen
25 wurde (Akamatsu et al. J. Invest. Dermatol. 1992;99:509-511). Sekundäre Kulturen konnten in einem Medium, welches durch entfettetes Serum ergänzt wurde (Zouboulis et al. J. Invest. Dermatol. 1993;101:628-633), sowie in serumfreiem Keratinozyten-Basalmedium ohne Zusätze (Akamatsu et al. J. Invest. Dermatol.
30 1992;99:509-511) aufrechterhalten werden. Ferner wurde gezeigt, daß der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) die Ausbeute und die Proliferation menschlicher Sebozyten merklich verbesserte (Chen et al. J. Invest. Dermatol. 1998;110:84-89).

35 Trotz dieser technischen Verbesserungen wird die weitere Entwicklung stark dadurch behindert, daß das Kultivieren einer

großen Zahl von Sebozyten aus isolierten menschlichen Talgdrüsen schwierig ist. Insbesondere besteht die Schwierigkeit, das Zellenmaterial für eine lange Zeitdauer in Kultur zu halten. Als Grund dafür wird die Neigung der Sebozyten angenommen, sich zu differenzieren und durch eine spontane Zellmembranruptur und Freisetzung ihres Inhaltes zu sterben. Das beste Resultat wurde bisher von Fujie et al. (Arch. Dermatol. Res. 1996;288:703-708) erreicht, die Talgdrüsen auf der Grundlage der Technik von Xia et al. (1989) isolierten und Sebozyten mittels der Methode der dispergierten Zellkultur sechs Subkulturen in serumfreiem, Keratinozyten-Wachstumsmedium ohne Haftungszellschicht kultivierten.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Sebozyten bereitzustellen, die über eine höhere Anzahl von Subkulturen hinweg in Kultur gehalten werden können. Dabei soll sich die bereitgestellten Sebozyten in ihrem Erscheinungsbild den morphologischen, phänotypischen und funktionellen Charakteristika von lebenden, normalen, menschlichen Sebozyten ähneln bzw. soweit annähern, daß sie sich als zelluläres bzw. Zellkulturmodell für fetthaltige, talgproduzierende Zellen und insbesondere für Sebozyten zu physiologischen, pathophysiologischen und pharmazeutischen Untersuchungen gut eignen.

Die Erfindung wird durch die Bereitstellung von Sebozyten gelöst, die immortalisiert sind. Geeigneterweise, da es für nützliche Anwendungen von vorrangigem Interesse ist, stammen die erfindungsgemäßen Zellen vom Menschen. Sebozyten dieser Art liegen vor in der menschlichen Talgdrüsenzelllinie SZ95, die bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC2383 hinterlegt wurde.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Abbildungen (Fig.) näher erläutert. Fig. 1 und Fig. 2

zeigen, daß die bereitgestellten immortalisierten Sebozyten SZ95 das epitheliale, polymorphe Aussehen der primären normalen Sebozyten, aus denen sie stammen (hier vom Menschen), behalten haben. Darüberhinaus exprimieren die bereitgestellten

5 immortalisierten Sebozyten und ihre Klone (Klon=Zellen, die gesichert aus einer einzigen Zelle stammen) das charakteristische, 94-kD-große SV-40-Große-T-Antigen; mit dessen kodierenden DNA-Sequenz sie transfiziert wurden, auch in

10 späteren Subkulturen. Die Fig. 1 zeigt (a) normale, menschliche Sebozyten der zweiten Subkultur, aus denen die bereitgestellten immortalisierten Sebozyten stammen, (b) eine adhärente Sebozytenkultur aus bereitgestellten immortalisierten Sebozyten in der ersten Subkultur, (c) bereitgestellte immortalisierte Sebozyten (50. Subkultur eines Klons). Alle Zellen zeigen eine

15 ähnelnde epitheliale, polymorphe Struktur. Die Fig. 2. zeigt (a) Zytozentrifugen-Präparate bereitgestellter immortalisierter Sebozyten und (b) der endothelialen Zellkultur HMEC-1, die als positive Kontrolle diente, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen das menschliche SV-40-Große-T-Antigen gefärbt sind. Beide

20 Präparate sind positiv gefärbt und zeigen, daß das menschliche SV-40-Große-T-Antigen überwiegend im Zellkern, teils auch im Zellzytoplasma, lokalisiert ist. In (c) wird die Expression des menschlichen SV-40-Großen-T-Antigen in den bereitgestellten immortalisierten Sebozyten mittels Westernblot dargestellt.

25 Während das menschliche SV-40-Große-T-Antigen bei nicht-transfizierten, normalen menschlichen Sebozyten (Spur 1) und normalen menschlichen epidermalen Keratinozyten (Spur 2) nicht nachweisbar war, wurde das charakteristische 94-kD-große Protein in Proteinextrakten der bereitgestellten immortalisierten

30 Sebozyten in der 34. Subkultur (Spur 3) sowie von drei isolierten Klonen (Spur 4, 5 bzw. 6) nachgewiesen.

Die immortalisierten Sebozyten der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise menschlichen Ursprungs. Die Bedeutung des Ausdrucks

35 "Sebozyten" ist im weitesten Sinne zu verstehen, d.h. betreffend alle Zellen, die mehr oder weniger fetthaltig, talgproduzierend

sind. Talg (Sebum) setzt sich überwiegend aus verschiedenen Fetten zusammen. Dabei kann der Fettinhalt der Zellen sowohl hinsichtlich der Fettfraktionen als auch hinsichtlich der Gehalte der Fettfraktionen variieren. In der Regel, aber nicht notwendigerweise, umfaßt der Fettinhalt der Zellen freie Fettsäuren, Triglyceride, Wachse, Squalen, freies Cholesterin, Cholesterinester, Dihydroxycholesterin und andere Steroide sowie andere Kohlenwasserstoffe. Insbesondere werden solche immortalisierten Sebozyten bevorzugt, die von der menschlichen Talgdrüsenzelle stammen. Eine besonders gute Eignung für medizinische Zwecke ergibt sich, wenn die Sebozyten aus menschlichen Gesichtstalgdrüsenzellen stammen.

Ein wesentliches Charakteristikum der erfindungsgemäßen Sebozyten besteht in ihrer Immortalisierung. Immortalisiert im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet das grundsätzliche Aufrechterhalten des Vitalzustandes der Zellen über eine Vielzahl von Subkulturen hinweg. Die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten SZ95 konnten in der zurückliegenden Beobachtungszeit von etwa 4½ Jahren über mehr als 50 Subkulturen in Kultur gehalten werden, wohingegen normale menschliche Sebozyten nur über drei bis sechs Subkulturen wachsen können, bevor sie absterben.

Die immortalisierten Sebozyten gemäß der vorliegenden Erfindung können erhalten werden, indem normale Sebozyten - in der bevorzugten Ausführungsform menschlichen Ursprungs und insbesondere aus der menschlichen Talgdrüse - mit einer DNA transfiziert wird, die stabile, inaktive Komplexe mit proliferationshemmenden Genen aufbaut. Eine besonders erfolgreiche Immortalisierung wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung durch Transfektion normaler menschlicher Sebozyten erreicht, insbesondere aus Gesichtstalgdrüsen stammend, mit einer DNA, die DNA-Sequenzen umfaßt, welche für das Große-T-Protein von SV-40 kodiert. Die immortalisierende Wirkung des SV-40-Großen-T-Antigens (Proteins) sowie die entsprechende

Verwendung der kodierenden DNA-Sequenz zur Transfektion menschlicher Zellen ist an sich bekannt. So wurden immortalisierte Zelllinien durch Transfektion mit einer für SV-40 T kodierenden DNA beispielsweise aus anderen Zellen epithelialen Ursprungs (siehe Tohyama et al. Tohoku. J. Exp. Med. 1997;182:75-82; Bae et al. Prostate 1998;34:275-282) sowie endothelialen Ursprungs (siehe Ades et al. J. Invest. Dermatol. 1992;99:683-690 und WO-A-92/17569) erhalten.

Es hat sich herausgestellt, daß eine Sebozyten-Transfektion nach einer Gentransfermethode mittels Anwendung kationischer Lipide (LIPOFECTIN-Reagens; das eine 1:1 (w/w) liposomale Formulierung der kationischen Lipide DOTMA [1,2-Diolyloxypropyl-3-trimethylammoniumchlorid] und DOPE [Diolyolphosphatidylethanolamin] in membrangefiltertem Wasser [1 mg/ml] beinhaltet), bei der die Fremd-DNA über kationische Lipide-DNA-Komplexe durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird (siehe Wang et al. In. Vitro. Cell. Dev. Biol. 1991;27A:63-74; Staedel et al. J. Invest. Dermatol. 1994;102:768-772), gute Ergebnisse bei der Immortalisierung lieferte, wobei in der Transfektionsmischung vorzugsweise 0,25 bis 2,0 Vol.-% und insbesondere 2,0 Vol.-% LIPOFECTIN-Reagens sowie 0,05 bis 0,5 Gew.-% und insbesondere 0,5 Gew.-% Fremd-DNA in einem geeigneten Transfektionspuffer eingesetzt waren. Die Fremd-DNA, wie die für das SV-40-Große-T-Protein kodierende DNA, ist dabei üblicherweise in einem geeigneten Vektor insertiert, bei dem die Expression des SV-40-Großen-T-Proteins vorzugsweise mittels Promotor- und Enhancer-Sequenzen gesteigert ist. Sind die normalen menschlichen Sebozyten in der bevorzugten Ausführung durch die DNA transfiziert, die für das SV-40-Groß-T-Antigen kodiert, so ist zu erwarten, daß die bereitgestellten Sebozyten nach der erfolgreichen Transfektion und Immortalisierung das Große-T-Antigen von SV-40 exprimieren. Dies wurde für die bereitgestellten immortalisierten Sebozyten gemäß der vorliegenden Erfindung immunzytochemisch und durch Westernblot-

Analysen unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen das SV-40-Groß-T-Antigen bestätigt.

Die so erhaltenen, immortalisierten Sebozyten liegen

5 vorzugsweise in Form einer Zelllinie vor und können in dieser Form in hervorragender Weise für die Anwendungszwecke eingesetzt werden.

Die immortalisierten Sebozyten gemäß der vorliegenden Erfindung
10 wuchsen nach Anpassung an serumfreies Kulturmedium besser als nicht-transfizierte, normale menschliche Sebozyten, und sie hielten ihre Fähigkeit aufrecht, Talgdrüsen-spezifische Lipide zu synthetisieren - im Gegensatz zu den in serumfreiem Medium gehaltenen, nicht-transfizierten normalen menschlichen
15 Sebozyten. Die erfindungsgemäßen immortalisierten Sebozyten können somit als stetig erneuerbare und vermehrungsfähige Zelllinie dienen und in definierten Kulturmedien wachsen.

Ein besonderer Wert der erfindungsgemäßen, immortalisierten
20 Sebozyten besteht darin, daß sie in morphologischer, phänotypischer und funktioneller Hinsicht Merkmale von nicht-transfizierten, normalen und differenzierenden Sebozyten aufweisen. Dadurch bieten sich die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten in hervorragender Weise als Modell zu
25 physiologischen, pathophysiologischen und pharmakologischen Untersuchungen an. Gleichzeitig wird der Nachteil der begrenzten Lebensfähigkeit herkömmlicher, in Kultur gehaltener normalen Sebozyten menschlichen Ursprungs vermieden. So konnte bestätigt werden, daß immortalisierte Sebozyten gemäß der vorliegenden
30 Erfindung einen normalen Sebozyten-Phänotyp weitgehend aufrechterhalten und sich in funktioneller Hinsicht ähnlich wie nicht-transfizierte, normale menschliche Gesichtssebozyten verhalten können.

35 Es wurde festgestellt, daß die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten bzw. die Sebozytenlinie (Sebozyten-

Zelllinie) eine polymorphe, epitheliale Erscheinung zeigen, die derjenigen nicht-transfizierter, normaler menschlicher Sebozyten ähnelt. In der Zellkultur erschienen Zellen unterschiedlicher Größe und intrazellulärer Struktur, was auf unterschiedliche
5 Stadien in der Zellreifung hinwies. So wurden Zellen unterschiedlicher Größe, durchschnittlich bis hin zur 5-fachen bzw. 6-fachen Größe bei konfluentem Wachstum, beobachtet, was im wesentlichen der Zellgrößensteigerung von nicht-transfizierten, normalen menschlichen Sebozyten mit progressiver Differenzierung
10 in vitro (durchschnittlich 4- bis 5,5-facher Größenunterschiede) entspricht. Des weiteren wurden wie bei nicht-transfizierten, normalen menschlichen Sebozyten reichlich Fettpartikel im Zytoplasma der erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten gefunden. Die Synthese der charakteristischen Talgdrüsenlipide
15 Squalen und Wachsester, wie es für normale menschliche Sebozyten üblich ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung experimentell bestätigt. Ferner synthetisierten die immortalisierten Sebozyten der vorliegenden Erfindung freie Fettsäuren - was wiederum mit den Erkenntnissen über nicht-
20 transfizierten, normalen menschlichen Sebozyten in vitro korreliert - und zwar sogar nach einer bereits hohen Zahl von Subkulturen.

Auch Expressionsmarker, die einen Sebozytenursprung bestätigen
25 und eine intakte Differenzierung aufzeigen, wurden als typische Anzeichen für Sebozyten bei der erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten bzw. Sebozytenlinie bestätigt. So exprimierten die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten bzw. die Sebozytenlinie für Sebozyten typische Antigene der
30 humanen polymorphen epithelialen Mukoproteingruppe, wie das Talgdrüsenantigen, humanes MilCHFettglobulin-1 und -2, humanes epitheliales Sialomucin, das Thomsen-Friedenreich-Antigen, Muzin-ähnliches-Karzinom assoziiertes Antigen sowie epitheliales Membranantigen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung
35 immunozytochemisch und durch Westernblot-Analyse bestätigt. Darüber hinaus exprimierten die erfindungsgemäßen,

immortalisierten Sebozyten bzw. die Sebozytenlinie die für nicht-transfizierte, normale menschliche Sebozyten typischen Keratin-Antigene, wie solche der Sub-Klassen 7, 13 und 19. Der Antigenphänotyp belegte somit den Sebozytenursprung sowie die
5 Sebozytendifferenzierung.

Auch in funktioneller Hinsicht verhalten sich die immortalisierten Sebozyten bzw. die Sebozytenlinie der vorliegenden Erfindung ähnlich zu nicht-transfizierten, normalen menschlichen Sebozyten. So sprachen die immortalisierten Sebozyten der vorliegenden Erfindung auf die Einwirkung durch Androgene an, wie z.B. bei 5 α -Dihydrotestosteron, indem ihre In-Vitro-Proliferation gesteigert wurde. Ferner besaßen die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten bzw. die
10 Sebozytenlinie die Fähigkeit, ihre Proliferation durch Einwirkung von Retinoiden, insbesondere solche des nicht-aromatischen Typs (z.B. 13-cis-Retinsäure, all-trans-Retinsäure), zu verändern.
15

Eine bevorzugte Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß die immortalisierten und vorzugsweise menschlichen Sebozyten kloniert sind. Dies hat den Vorteil, daß die immortalisierten Sebozyten bzw. die daraus entstehende Sebozytenlinie mittels der einheitlichen genomischen Basis gut
20 definiert und spezifisch charakterisiert sind. Eine klonierte und immortalisierte menschliche Sebozytenlinie wurde geeigneterweise erhalten, indem immortalisierte Sebozyten in Kulturgefäßen solange verdünnt wurden, bis die Zellteilung von lediglich einer Zelle pro Kulturgefäß neu einsetzte. Dies konnte
25 mittels mikroskopischer Beobachtungen überwacht und kontrolliert werden.
30

Somit wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß die erhaltenen, immortalisierten menschlichen Sebozyten bzw.
35 die daraus entstehende Sebozytenlinie ihre Sebozytenidentität im Vergleich zu nicht-transfizierten, normalen menschlichen

Sebozyten erhielten. Dies wurde durch Charakterisierungs-
kontrollen und funktionelle Tests bestätigt.

Eine Sebozytenlinie mit der Bezeichnung SZ95, die die oben
5 genannten Vorteile der vorliegenden Erfindung in sich vereinigt,
stellt die unter der Hinterlegungsnummer ACC2383 bei der DSMZ
hinterlegten Talgdrüsenzell (Sebozyten)-Linie dar. -

Somit bieten die immortalisierten Sebozyten bzw. die
10 Sebozytenlinie gemäß der vorliegenden Erfindung ausgezeichnete
Möglichkeiten für sehr nützliche Anwendungen. Generell können
die Sebozyten bzw. die Sebozyten-Zelllinie gemäß der Erfindung
für diagnostische, für therapeutische oder für kosmetische
Ansätze eingesetzt werden. Speziell dienen die oben
15 beschriebenen Sebozyten bzw. die Sebozytenlinie zu
Untersuchungen der Physiologie oder der Pathophysiologie von
lipidhaltigen, talgproduzierenden Zellen, insbesondere von
menschlichen oder tierischen Talgdrüsenzellen, sowie deren Rolle
in pathophysiologischen Prozessen der Haut und in
20 Hautkrankheiten wie z.B. der Akne. Mit Hilfe der Erfindung kann
so die Entstehung der Akne und/oder der Seborrhoe und/oder
anderer Erkrankungen, insbesondere von Hautkrankheiten, bei
denen die Talgdrüsenfunktion eine Rolle spielt oder spielen
kann, untersucht werden. Die Gegenstände der vorliegenden
25 Erfindung dienen ferner als ausgezeichnete Modelle zum Testen
und zur Beurteilung von Anti-Akne- und/oder Anti-Seborrhoe-
Verbindungen oder -Mitteln aber auch von Mitteln gegen
Erkrankungen, insbesondere von Hautkrankheiten, bei denen die
Talgdrüsenfunktion eine Rolle spielt oder spielen kann. Gerade
30 vor der Durchführung klinischer Studien sind solche In-Vitro-
Untersuchungen zu pharmakologischen Eigenschaften von
Medikamente nützlich.

Die oben beschriebenen Sebozyten oder Sebozytenlinie gemäß der
35 Erfindung haben ferner den Vorteil, daß damit weitere
Zellkultursysteme etabliert werden können. Dies schließt die

Entwicklung von einfachen und von komplexen Zellkultursystemen ein. Einfache Zellkultursysteme bedeutet in der Regel zweidimensionale Einschicht- oder Mehrschicht-adhärenzte Kulturen oder nicht-adhärenzte Kulturen und werden beispielsweise
5 gebildet, indem man die oben beschriebenen Sebozyten mit anderen Zellarten einmischt oder getrennt durch semi- oder nicht-permeablen Membranen kultiviert (Schwartz et al. J. Surg. Res. 1998;76:79-85; Nackman et al. Surgery. 1998;124:353-61).

Komplexe Zellkultursysteme bedeutet in der Regel eine
10 dreidimensionale Kultivierung einschichtiger oder mehrschichtiger Kulturen und werden beispielsweise gebildet, indem man die Zellen als Sphäroide, auf Sphäroide, in Kollagen oder in anderen Gelpräparaten oder in einer künstlichen Haut-ähnlichen Struktur kultiviert (Korff und Augustin. J. Cell.
15 Biol. 1998;143:1341-1352; Hamamoto et al. J. Biochem. (Tokyo) 1998;124:972-979; Desoize et al. Anticancer. Res. 1998;18:4147-4158; Hamilton. Cancer. Lett. 1998;131:29-34; Niemann et al. J. Cell. Biol. 1998;143:533-545; Awata et al. J. Gastroenterol. Hepatol. 1998;13 Suppl:S55-61; Voura et al. Microsc. Res. Tech.
20 1998;43:265-275; Pipili-Synetos et al. Br. J. Pharmacol. 1998;125:1252-1257; Vasile et al. J. Histochem. Cytochem. 1999;47:159-168; Michalopoulos et al. Hepatology. 1999;29:90-100; Trent und Kirsner. Int. J. Clin. Pract. 1998;52:408-413; Fransson et al. Br. J. Dermatol. 1998;139:598-604; Konstantinova
25 et al. Arch. Dermatol. Res. 1998;290:610-614; Black et al. FASEB. J. 1998;12:1331-1340; Zhao et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;254:49-53).

Eine besonders brauchbare Nutzung betrifft die Bildung von
30 dreidimensionalen Zellansammlungen oder die Konstruktionen bzw. Rekonstruktionen organähnlicher Strukturen aus den erfindungsgemäßen Sebozyten bzw. der erfindungsgemäßen Sebozytenlinie. Hierfür werden die Sebozyten allein, vorzugsweise aber zusammen mit weiteren, hautaufbauenden Zellen,
35 insbesondere mit Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten, Endothelzellen, Langerhans-Zellen und/oder Zellen aus dem

Haarfollikel eingesetzt. Zur Bildung solcher dreidimensionaler Zellansammlungen oder Konstruktionen bzw. Rekonstruktionen organähnlicher Strukturen wird geeigneterweise zunächst ein Stützgerüst mit Kollagen oder anderen Gelpräparaten und/oder mit
5 Stücken von inaktiviertem Gewebe bereitgestellt, und danach die genannten Zellen in oder auf dieses Stützgerüst ein- bzw. aufgebracht werden. Diese Methode ist dem Fachmann an sich bekannt und erste Präparate sind im Handel erhältlich (Trent und Kirsner. Int. J. Clin. Pract. 1998;52:408-413; Fransson et al.
10 Br. J. Dermatol. 1998;139:598-604; Konstantinova et al. Arch. Dermatol. Res. 1998;290:610-614; Black et al. FASEB. J. 1998;12:1331-1340; Zhao et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;254:49-53). Auf diese Weise wird eine "künstliche Haut" oder ein Hautersatz hergestellt, was ausgezeichnete Möglichkeiten für
15 die Transplantationsmedizin, für die Rekonstruktion von defekten Hautpartien wie z.B. verbrannter Haut, oder zur Therapie von Hautläsionen bietet. Mit Hilfe der Erfindung kann diese "künstliche Haut" auch Fett/Talg in ausreichender Menge synthetisieren, wenn die erfindungsgemäßen Sebozyten in diesem
20 Konstrukt eingebracht werden.

Ein weiteres Gebiet sehr nützlicher Anwendungen betrifft die Herstellung von Produkten, die von den erfindungsgemäßen Sebozyten bzw. der erfindungsgemäßen Sebozytenlinie stammen.
25 Dies schließt die Isolierung und Reinigung von zellulären Substanzen, wie Lipide, Proteine, DNA und/oder RNA, ein. Da die Zellen immortalisiert sind, stehen sie als stete Quelle für solche zelluläre Substanzen zur Verfügung. Spezielle Beispiele für sehr brauchbare Substanzen, die auf diese Weise aus den
30 Zellen erhältlich sind, schließen ein: Hautlipide für die Anwendung in topischen Mitteln und Medikamenten, die im untenstehenden Beispiel 3 im Zusammenhang mit der phänotypischen Charakterisierung der Sebozyten genannten, antigenen Proteine, und ferner die Erzeugung von Plasmid-DNA oder Vektor-DNA. Die
35 Erzeugung von Plasmid-DNA oder Vektor-DNA erfolgt auf dem Fachmann bekanntem gentechnologischen Wege; damit können z.B.

Gene erfaßt werden, die die Lipidproduktion induzieren. Gerade mit solchen, geeigneten Plasmid- und Vektor-Konstrukten, wobei die Bildung viraler Vektoren ebenfalls in Betracht gezogen werden können, können wiederum andere Zellen oder Organismen
5 modifiziert oder transfiziert werden.

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend anhand nicht einschränkender Beispiele näher erläutert.

10

Beispiele

Für die anschließend beschriebenen Beispiele können die nachfolgend beschriebenen materiellen und methodischen
15 Ausgestaltungen Anwendung finden. Die Beispiele sind jedoch nicht einschränkend zu verstehen.

Zellkulturen

20

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Zellen als adhärente Kulturen in einem Medium gehalten, welches aus modifiziertem DMEM/Ham's F12-Medium (1:1) (erhältlich von Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 2 mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin bestand,
25 welches mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FCS; Biochrom) sowie 50 µg/ml Gentamycin (erhältlich von Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland) ergänzt war. Die Kultur wurde bei 37°C in feuchter Atmosphäre, die 5% CO₂ enthielt, gehalten, und das Kulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage erneuert.

30

Isolierung und Kultivierung normaler menschlicher Sebozyten

Normale Sebozyten wurden von der Gesichtshaut einer 87-jährigen
35 weiblichen Patientin, die einer Operation unterzogen wurde, isoliert, wie es von Xia et al. (J. Invest. Dermatol.

1989;93:315-321) beschrieben wurde. Die isolierten Talgdrüsen wurden ohne Haftungszellschicht in dem Standardmedium kultiviert, welches mit 9 ng/ml Epidermal-Growth-Factor (EGF), 9 ng/ml Keratinocyte-Growth-Factor (KGF) (beides erhältlich von
5 Boehringer Mannheim, Deutschland), 0,4 µg/ml Hydrocortison (erhältlich von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sowie 10^{-9} M Choleratoxin (erhältlich von Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) ergänzt war. Kulturen primärer normaler Sebozyten ergaben sich als Auswuchs aus der Peripherie der Talgdrüsenläppchen.

10

Immunzytochemische Untersuchungen

Dispergierte Zellen aus subkonfluente normale Sebozytenkulturen
15 wurden auf Glas-Objektträgern mittels Zytozentrifugation angeheftet. Die Proben wurden luftgetrocknet und mittels kaltem Aceton über 10 Minuten fixiert. Die Präparate wurden dann mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper oder einem Kontrollantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
20 Gebundene Antikörper wurden nachgewiesen durch Kopplung mit einer 1:100-Verdünnung eines monoklonalen Antikörperkonjugats aus Kaninchen-/Anti-Maus-IgG (H+L) und einem Alkalische Phosphatase/Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (erhältlich von Dianova, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten bei
25 Raumtemperatur. Primäre und sekundäre monoklonale Antikörper wurden verdünnt in Lösungen, die 10% RPMI-1640 und 10% FCS bei einem pH von 7,4 enthielten. Die Waschschritte wurden dreifach mit PBS-Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (erhältlich von Biochrom) durchgeführt. Die Präparate wurden für 30 Minuten in gepufferter
30 Lösung (pH 8,8) angefärbt mit Neufuchsin als Haftungssagens und einem Naphtholsalz als Kupplungssagens (beides von Sigma), gegengefärbt mit Mayer's Haemalum (Merck, Darmstadt, Deutschland), abgedeckt und unter einem Lichtmikroskop beurteilt.

35

Isolierung und Quantifizierung von Proteinen

Um zelluläre Proteine zu isolieren, wurden Zellkulturen zweimal mit PBS gewaschen, direkt in den Kulturgefäßen mittels einer kalten Lösung lysiert, die aus 50 mM HEPES, 1% Nonidet P-40 (erhältlich von ICN, Aurora, OH, USA), 150 mM NaCl sowie einem Proteaseinhibitor (CompleteTM Mini; erhältlich von Boehringer Mannheim) bestand, anschließend abgeschabt und in kleinen Zentrifugationsgefäßen geerntet. Das gewonnene Material wurde mittels Ultraschalleinwirkung homogenisiert, zentrifugiert, und die Überstände wurden auf Eis gehalten. Bicinchoninsäure (BCA-Protein-Assay; erhältlich von Pierce, Rochford, IL, USA) wurde zugegeben, um das Gesamtprotein sichtbar zu machen, und die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 550 nm quantifiziert.

Westernblot-Analyse

Aliquots des isolierten Proteins (20 µg) wurden für 15 Minuten auf 95°C erhitzt. Eindimensionale SDS/PAGE-Elektrophorese wurde bezüglich jeder Probe auf 7,5-prozentigen Gelen durchgeführt. Dann wurden Proteine auf eine Transfermembran (Immobilon-P aus PVDF; erhältlich von Millipore, Eschborn, Deutschland) unter Verwendung eines Standard-Blotsystems (erhältlich von Bio-Rad, München, Deutschland) übertragen. Die Blots wurden mit primärem, monoklonalem Antikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit Meerrettichperoxydase-konjugiertem Ziege/Anti-Maus-monoklonalem Antikörper bzw. Ziege/Anti-Kaninchen-monoklonalem Antikörper (erhältlich von Oncogene Science) in einer Verdünnung von 0,2 µg/ml für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden Signale durch die Chemilumineszenzmethode unter Verwendung einer Standard-Assay (ECL, erhältlich von Amersham, Braunschweig) auf Röntgenstrahl-empfindlichen Filmen (XAR 5; erhältlich von Kodak,

Rochester, NY, USA) sichtbar gemacht, wobei mehrere Bestrahlungsintervalle eingestellt wurden.

5 Ölrot- und Nilrot-Anfärbung

In Kammerobjektträgern wachsende Zellen wurden entweder mit 0,6 %-iger Lösung von Ölrot (Sigma) in 60 %igem Isopropanol für 15-120 min. oder mit 1 µg/ml Nilrot-Farbstoff (erhältlich von Kodak) für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert, wie von Xia et al. (1989) (*supra*) beschrieben. Die Kulturen wurden dann unter einem Lichtmikroskop (nach Ölrotanfärbung) oder einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 450-500 nm Bandpass-Anregungsfilters mittels Lichtemission über 528 nm (nach Nilrotanfärbung) beobachtet.

Durchflußzytometrie

Dispergierte, nicht-markierte Zellen wurden zur Bestimmung der Zellgröße mittels eines herkömmlichen Sorters sortiert, während mit Nilrot-Farbstoff (erhältlich von Kodak) markierte Zellen zur Bestimmung des Lipidgehalts durchflußzytometrisch auf Fluoreszenzbasis bestimmt wurden. Es wurden 10.000 Zellen pro Probe untersucht.

Markierung und Extraktion von Lipiden

Zellkulturen wurden in Kulturmedium für zwei Tage gehalten und dann mit einem radioaktiven Puls versetzt über das Natriumsalz von [2-¹⁴C]-Essigsäure (45-60 mCi/mmol; erhältlich von Dupont-NEN, Boston, MA, USA) in einer Konzentration von 0,5 µCi/ml in RPMI-1640-Medium, zu dem 2mM L-Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, und 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt war. Danach wurde für weitere 24 Stunden inkubiert.

Lipide wurden aus kultivierten Zellen und aus dem überstehenden Kulturmedium isoliert und aufgetrennt nach neutralen Lipiden, Fettsäuren und Phospholipiden (siehe Seifert et al. J. Invest. Dermatol. 1997;108:375).

5

Die Größentrennung nach Fraktionen und die Sichtbarmachung von neutralen Lipiden und freien Fettsäuren wurden durch Hochleistungs-Dünnschichtchromographie (HPTLC) erhalten, die auf 20x10 cm² großen Silicagel-beschichteten Glasplatten (erhältlich von Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt wurden. Die Platten wurden mit n-Hexan vorbehandelt und für 24 Stunden getrocknet. Die Proben wurden durch einen automatischen Lipid-Applikator (Linomat IV; Camag, Berlin, Deutschland) aufgetragen. Chromatogramme der neutralen Lipide wurden in einer n-Hexan/Diethylether-Lösung (9:1) auf 9 cm entwickelt, getrocknet und in einer Lösung von Chloroform/Diethylether/Ethylelessigsäure (80:4:16) auf 4,5 cm nachentwickelt. Zur Belichtung wurden Belichtungsbögen (TR2040S, erhältlich von Fuji, Tokyo, Japan) eingesetzt, welche dann unter Verwendung eines Bildanalysiergerätes ("BAS 1000 Bio-Imaging Analyser", Fuji) abgescannt wurden. Lipidstandards wurden als Vergleichsproben eingesetzt.

25 Untersuchung des Wachstumsverhaltens

Die Zellen wurden in 96-Well-Kulturplatten bei Dichten von 0,5 bis 4x10³ Zellen/Well angesät. Die Zellproliferation wurde durch den 4-Methylumbelliferyl-Heptanoat-Fluoreszenzassay beurteilt und automatisch gemessen (Zouboulis et al. Melanoma. Res. 1991;1:91-95).

Hierfür wurde am Tag der Beurteilung das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, und 100 µl einer 100 µg/ml-Lösung von 4-Methylumbelliferyl-Heptanoat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in PBS wurden zu jedem Well

35

hinzugegeben. Die Platten wurden dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, und die abgegebene Fluoreszenz wurde mit einem geeigneten Fluoreszenz-Meßgerät gemessen (Titertec Fluoroscanner II; Flow, Meckenheim, Deutschland). Fluoreszenz-Einheiten wurden erhalten bei 355 nm Anregungs- und 460 nm Emissions-Filtern.

Behandlung mit 5 α -Dihydrotestosteron und Retinoiden

5 α -Dihydrotestosteron (5 α -DHT; Sigma) wurden in DMSO aufgelöst und anschließend in serum- und phenolfreiem modifiziertem DMEM/Ham's F12-Medium (1:1) (Gibco-BRL) mit 2 mM n-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin eingebracht, welches mit 5 ng/ml EGF, 50 μ g/ml Rinderhypophysenextrakt, 1 mg/ml Fettsäure-freiem Rinderserumalbumin (Böhringer Mannheim) und 50 μ g/ml Gentamycin versetzt war, so daß sich eine Endkonzentration von 10⁻⁶ M 5 α -DHT und 0,1% DMSO ergab. 0,1% DMSO allein diente als Kontrolle. Die Zellen (0,5 bis 2 x 10³ pro Well) wurden für 18 Tage mit 5 α -DHT behandelt.

Zur Behandlung mit Retinoiden wurden all-*trans*-Retinsäure, 13-*cis*-Retinsäure und Acitretin in DMSO gelöst und anschließend in serumfreies modifiziertes DME-Medium/Ham's F12-Medium (1:1) mit 2 nM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin eingebracht, welches mit 5 ng/ml EGF, 50 μ g/ml Rinderhypophysenextrakt, 1 mg/ml fettsäurefreiem Rinderserumalbumin und 50 μ g/ml Gentamycin versetzt war, so daß sich eine Endkonzentration von 10⁻⁷ M Retinoid und 0,1% DMSO ergab. 0,1 % DMSO allein diente als Kontrolle. Retinoide wurden unter abgedunkeltem gelbem Licht gehandhabt. Die Zellen (0,5 bis 1 x 10³ pro Well) wurden für neun Tage mit den Retinoiden behandelt.

Statistische Analyse

Wachstumsstudien wurden unter Zugrundelegung von sechsfachen Ansätzen in 96-Well-Platten beurteilt. Alle anderen

5 Untersuchungen wurden in Triplikat-Ansätzen durchgeführt.

Beispiel 1

10 Transfektion normaler menschlicher Sebozyten

Der zur Transfektion normaler menschlicher Sebozyten verwendete Vektor mit der Bezeichnung pSVT war ein Plasmidkonstrukt auf der Basis von PBR 322, welcher Sequenzen für das Große-T-Protein von

15 SV-40 aufwies, wobei die Proteinexpression durch das Long-Terminal-Repeat des Rous Sarcoma Virus angetrieben wurde (siehe Dutt et al. Oncogene. 1990;5:195-200; Wang et al. In. Vitro. Cell. Dev. Biol. 1991;27A:63-74). Die zweite Subkultur normaler

20 menschlicher Sebozyten wurde auf 50% Konfluenz in 35 mm-Kulturgefäßen (Becton Dickinson, Plymouth, UK) wachsen gelassen und zur Transfektion eingesetzt. Die Transfektion wurde auf der Basis einer Gentransfermethode mittels Anwendung kationischer Lipide durchgeführt. Dazu wurde das LIPOFECTIN-Reagens

25 eingesetzt, das eine 1:1 (w/w) liposomale Formulierung der kationischen Lipide DOTMA (1,2-Diolyloxypropyl-3-trimethylammoniumchlorid) und DOPE

(Diolyolphosphatidylethanolamin) in membrangefiltertem Wasser (1 mg/ml) beinhaltet. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt, die Kulturzellen wurden zweimal mit serumfreiem Medium (Opti-MEM von

30 Gibco-BRL) gewaschen und in diesem Medium für vier Stunden inkubiert. Das Medium wurde dann durch eine Transfektions-

mischung ersetzt, die aus einer Antibiotika-freien Menge Opti-MEM-Medium (1,5 ml) mit einer geeigneten Menge des LIPOFECTIN-Reagenses (Gibco-BRL; 5-30 µl, am besten 1,5 Vol.-%) sowie einer

35 geeigneten Menge an pSVT-DNA (1-10 µg) in einer Lösung mit 0,5 ml PBS (DNA-End-Konzentration am besten 0,5 Gew.-%) bestand. Die

Kulturen wurden für 24 h bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert, die 5% CO₂ enthielt. Die Kulturen wurden schließlich zweimal mit Kulturmedium gewaschen und, wie oben beschrieben, weiter im Sebozyten-Kulturmedium gehalten.

5

Nach der Transfektionsprozedur wurde eine dramatisch verringerte Lebensfähigkeit der pSVT-behandelten Sebozyten im Laufe von vier Wochen beobachtet. Es folgte aber insbesondere beim Einsatz optimaler Mengen an LIPOFECTIN-Reagens und pSVT-DNA das Auftauchen proliferierender Sebozytenkolonien. Diese Zellen (SZ95) konnten bis heute über 50mal passagiert werden. Sie sind nach wie vor lebensfähig über die Beobachtungszeit von 4½ Jahren.

10

15

Beispiel 2

Klonierung der immortalisierten menschlichen Sebozyten

Die so immortalisierten menschlichen Sebozyten SZ95 wurden in 96-Well-Kulturplatten ausgesät in einer Verdünnungsreihe mit geometrisch absteigenden Zellzahlen von 1×10^2 Zellen in der ersten Reihe bis zum Erreichen von theoretisch null Zellen in der letzten Reihe (Zouboulis et al. in "Das maligne Melanom der Haut", C.E. Orfanos und C. Garbe (Hrsg.) Zuckschwerdt, München, Deutschland: 1990;158-168). Die Zellen wurden in Standardkulturmedium gehalten, welches mit 5 ng/ml EGF und 3 ng/ml KGF versetzt war. Wachsende Zellen wurden als Klone betrachtet, wenn sie von einer einzelnen Zelle pro Well stammten, was durch lichtmikroskopische Untersuchungen beobachtet werden konnte. Somit wurden klonierte SZ95-Zellen erhalten.

20

25

30

35

Beispiel 3

Charakterisierung der immortalisierten menschlichen Sebozyten

5

Nachweis des SV-40-Großen-T-Antigens

Die Expression des Großen-T-Antigens von SV-40 in
immortalisierten Sebozyten wurde immunzytochemisch und mittels
10 Westernblot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen anti-
humanen SV-40-Groß-T-Ag-Antikörpers aus Mausserum (Oncogene
Science, Cambridge, MA, USA), der für die immunzytochemische
Analyse auf 1:1000 und für die Westernblot-Analyse 1:100
verdünnt war, nachgewiesen. Menschliche normale epidermale
15 Keratinozyten, dermale Fibroblasten und - als Positivkontrolle -
durch SV-40-Groß-T-Antigen immortalisierte endotheliale Zellen
HMEC-1 (siehe WO-A-92/17569) wurden zum Vergleich eingesetzt.

Die immunozytochemische Untersuchung der nach Beispiel 1
20 immortalisierten Sebozyten mit dem monoklonalen Antikörper gegen
das Groß-T-Antigen von SV-40 ergab eine starke, überwiegend
nukleäre, teils auch zytoplasmatische Anfärbung (siehe Fig. 2a).
Normale Keratinozyten und Fibroblasten waren gleichmäßig negativ
gegenüber dem SV-40-Groß-T-Protein, und die HMEC-1-Zellen als
25 Positivkontrolle zeigten überwiegend eine nukleäre, teils auch
zytoplasmatische, Färbung für das SV-40-Groß-T-Protein (siehe
Fig. 2b).

Fig. 2c zeigt die Ergebnisse der Westernblot-Analyse der SV-40-
30 Groß-T-Antigenexpression in nicht-tranfizierten normalen
menschlichen Sebozyten (Spur 1), in normalen menschlichen
epidermalen Keratinozyten (Spur 2), in immortalisierten
Sebozyten gemäß der Erfindung (34. Subkultur; Spur 3), sowie in
verschiedenen klonierten Sebozyten gemäß der Erfindung (Spuren
35 4, 5 und 6). Eine Bande bei 94 kD wurde für die immortalisierte
Sebozytenlinie sowie ihrer Klone nachgewiesen, was die

Expression des SV-40-Großen-T-Proteins bestätigte (siehe Harlow et al. J. Virol. 1981;39:861-869).

5 Phänotypische Charakterisierung der erfindungsgemäßen,
immortalisierten Sebozyten

Die Morphologie der gemäß Beispiel 1 immortalisierten Sebozyten SZ95 war epithelial und zeichnete sich durch eine polymorphe
10 Erscheinung mit Zellen unterschiedlicher Größe aus, wobei zahlreiche Tröpfchen im Zytoplasma beobachtet werden konnten (siehe Fig. 1b und c).

Immunozytochemische Untersuchungen mit entsprechenden
15 Antikörpern ergaben für die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten ein positives Resultat gegen das Talgdrüsenantigen - im Gegensatz zu normalen epidermalen Keratinozyten, die nicht mittels des monoklonalen Antikörpers gegen das Talgdrüsenantigen angefärbt wurden (siehe Fig. 3). Die Fig. 3. zeigt die
20 immunzytochemischen Ergebnisse auf Zytozentrifugationspräparate (a) der erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten sowie (b) normaler menschlicher epidermaler Keratinozyten. Die Präparate waren mit einem monoklonalen Antikörper gegen das
Talgdrüsenantigen angefärbt. Während die erfindungsgemäßen,
25 immortalisierten Sebozyten eine positive zytoplasmatische Färbung aufwiesen, waren die normalen menschlichen epidermalen Keratinozyten nicht gefärbt.

Darüber hinaus wurde über die Westernblot-Analyse die Expression
30 der Keratine 7, 13 und 19 sowie mehrerer Proteine der humanen polymorphen epithelialen Muzingruppe in den immortalisierten Sebozyten nachgewiesen, wohingegen menschliche Keratinozyten lediglich das Keratin 13 exprimierten (siehe Fig. 4). Für die Westernblot-Analyse gemäß Fig. 4 wurden das extrahierte
35 Gesamtprotein immortalisierter Sebozyten gemäß der Erfindung (34. Subkultur; Spur 1), verschiedener klonierter

immortalisierter Sebozyten gemäß der Erfindung (Spuren 2, 3 und 4) sowie normaler menschlicher epidermaler Keratinozyten (Spur 5) aufgetragen, und zwar zur Identifizierung der Expression von humanem epitheliale Sialomucin (ESM) (>400 kD), humanem
5 Milchfett-Globulin-1 (HMFG-1) (400 kD), humanem Milchfett-Globulin-2 (HMFG-2) (80-400 kD), Muzin-ähnlichem, Karzinom-assoziiertem Antigen (MCA) (350 kD), epitheliale Membranantigen (EMA) (250-400 kD), Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF-Antigen) (155 kD), Keratin 7 (54 kD), Keratin 13 (54 kD), Keratin 19 (40
10 kD) sowie der 5 α -Reduktase vom Typ 1 (5 α -Red. 1) (21-27 kD). Die immortalisierte Zelllinie sowie ihre Klone gemäß der Erfindung exprimierten alle untersuchten Proteine, wohingegen Keratinozyten nur das Keratin 13 und die 5 α -Reduktase vom Typ 1 exprimierten.

15

Lipidsynthese

Das Anfärben mit Nilrot und der Beurteilung mittels
20 Fluoreszenzmikroskopie zeigten die Gegenwart von Lipiden im Zellzytoplasma. In den erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten SZ95 (siehe Fig. 5), die mit auf neutrale Lipide gerichtetem Nilrot-Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden, ergaben einzelne oder in Gruppen vorliegende Lipidtröpfchen, die
25 im Zytoplasma der Sebozyten beliebig verteilt waren. Die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten verringerten ihren Lipidgehalt von 510 Fluoreszenzeinheiten pro Zelle (Mittelwert) in serumhaltigem Medium auf 429 Fluoreszenzeinheiten pro Zelle (Mittelwert; d.h. minus 16%) in serumfreiem Medium, was durch
30 fluoreszenzzytometrische Untersuchungen von Nilrot-angefärbten Zellen nachgewiesen wurde.

Die erfindungsgemäßen, immortalisierten Sebozyten gemäß Beispiel
1 synthetisierten mehrere Fraktionen neutraler Lipide, darunter
35 die typisch Talgdrüsenlipide Squalen und Wachsester sowie Triglyzeride, Cholesterol, Cholesterolester, Diglyzeride,

Lanosterol und freie Fettsäuren. Dies wurde über 25 bis 40 Subkulturen hinweg beobachtet. Dies ist in Fig. 6 gezeigt, wo HPTLC-fraktionierte Lipide nach der Pulsaufnahme von radioaktiv markiertem Natriumacetat über eine radiometrische Bildauswertung
5 detektiert wurden bei zwei ausgewählten, immortalisierten und klonierten Sebozytenkulturen (siehe Spuren 3 und 4 bzw. 5 und 6). Wie die Spuren 3, 4 und 5 zeigen, synthetisierten die Zellen mehrere Fraktionen neutraler Lipide, darunter Squalen (Sq), Wachsester (WE) sowie Triglyzeride (Tg), Cholesterol (Cho),
10 Cholesterolester (ChE), Diglyzeride (Dg), Lanosterol (Lan) sowie freie Fettsäuren (FFA). Alle neutralen Lipide wurden ebenso, wenn auch in geringerem Ausmaß, in den extrazellulären Überständen (siehe Spur 6) gefunden. Zum Vergleich wurden in Spur 1 Lipidstandards, in Spur 2 menschliches Sebum und in Spur
15 4 freie Fettsäuren, die aus Zellen extrahiert waren, aufgetragen. Als weiteren Vergleich zeigen die Spuren 7 und 8 die Resultate von Keratinozyten, wobei Spur 7 die Anwesenheit von hauptsächlich Cholesterol und Triglyzeriden in den Zellen anzeigt, während aus dem Überstand (Spur 8) überwiegend
20 Cholesterin gefunden wurde.

Proliferationsstudien

25 Ein logarithmisches Proliferationsmuster der immortalisierten Sebozyten gemäß der Erfindung wurden unter normalen Kulturbedingungen mit Populations-Verdopplungszeiten von 52,4 +/- 1,6 unabhängig von den ursprünglichen Kulturzelldichten nachgewiesen. Hierzu zeigt Fig. 7 die Proliferation einer
30 immortalisierten, klonierten Sebozytenzelllinie (SZ95) über 18 Tage in Sebozytenmedium.

Die Proliferation der immortalisierten Sebozyten war verringert nach Zugabe von serumfreiem Medium, wurde aber wieder aufgehoben
35 nach Zugabe von 5 α -DHT. Dies ist in Fig. 8 für einen beispielhaften Sebozytenklon gezeigt, wobei die Proliferation

der Zellen (Aussaat 2000 pro Well) über 18 Tage in serumfreiem Medium (Kontrolle) sowie in serumfreiem Medium, welches mit 10^{-6} M 5α -DHT versetzt war, beobachtet wurde. Nach dem 8. Tag erhöhte das 5α -DHT die Proliferation der Zellen beträchtlich, was sich an der festgestellten Populations-Verdopplungszeit von 136 Stunden (Kontrolle) und 53,7 Stunden (5α -DHT-behandelte Zellen) zeigte (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Das Einwirken von Retinoiden auf die immortalisierten Zellen zeigte ein unterschiedliches Ansprechen des Proliferationsverhaltens. Während manche Klone durch Retinoide in der Proliferation inhibiert wurden (typischerweise verschieden stark in der Reihenfolge 13-*cis*-Retinsäure > all-*trans*-Retinsäure >> Acitretin), wurden andere Klone in der Proliferation stimuliert (beispielsweise durch all-*trans*-Retinsäure und 13-*cis*-Retinsäure) entsprechend der Proliferationsantwort von normalen menschlichen epidermalen Keratinozyten. Dies ist in Fig. 9 gezeigt (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).


PCT

WO 25933

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.12.1999 02:55:02 PM

0-1	Formular - PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2.90 (aktualisiert 15.10.1999)
0-2	Internationales Aktenzeichen.	PCT/EP 99 / 09988
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WO 25933
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	3
1-2	Zeile	32
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	25 Januar 1999 (25.01.1999)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ ACC2383
1-4	Weitere Angaben	KEINE
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1-6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja <input checked="" type="checkbox"/> oder nein)	15 DEC 1999 (15. 12. 1999)
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	 M. Legendre

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

Patentansprüche

- 5 1. Sebozyten, die immortalisiert sind.
2. Sebozyten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie vom Menschen stammen.
- 10 3. Sebozyten nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie von der menschlichen Talgdrüse stammen.
4. Sebozyten nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Talgdrüsenzellen Gesichtstalgdrüsenzellen sind.
- 15 5. Sebozyten nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form einer Zelllinie vorliegen.
6. Sebozyten nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Transfektion von DNA
- 20 immortalisiert wurden.
7. Sebozyten nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Große-T-Antigen von SV-40
- 25 exprimieren.
8. Sebozyten nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie Merkmale von normalen, nicht-transfizierten und differenzierenden Sebozyten aufweisen.
- 30 9. Sebozyten nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ihre Proliferation mittels Androgenen und/oder Retinoiden veränderbar ist.

10. Sebozyten nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie kloniert sind.

11. Die menschliche Sebozyten-Zelllinie DSM ACC2383.

5

12. Verwendung der Sebozyten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder der menschlichen Sebozyten-Zelllinie gemäß Anspruch 11 für diagnostische, für therapeutische oder für kosmetische Ansätze.

10 13. Verwendung der Sebozyten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder der menschlichen Sebozyten-Zelllinie gemäß Anspruch 11 zur Untersuchung der Physiologie oder der Pathophysiologie der menschlichen oder der tierischen Talgdrüse.

15 14. Verwendung der Sebozyten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder der menschlichen Sebozyten-Zelllinie gemäß Anspruch 11 zur Untersuchung der Entstehung der Akne und/oder der Seborrhoe und/oder anderer Erkrankungen.

20 15. Verwendung der Sebozyten gemäß Anspruch 14, wobei die zu untersuchenden anderen Krankheiten Hautkrankheiten sind, bei denen die Talgdrüsenfunktion eine Rolle spielt oder spielen kann.

25 16. Verwendung der Sebozyten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder der menschlichen Sebozyten-Zelllinie gemäß Anspruch 11 zum Testen von Anti-Akne- und/oder Anti-Seborrhoe-Verbindungen oder -Mitteln.

30 17. Verwendung der Sebozyten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 oder der menschlichen Sebozyten-Zelllinie gemäß Anspruch 11 zum Testen von Verbindungen oder Mitteln gegen Erkrankungen.

35 18. Verwendung der Sebozyten gemäß Anspruch 17, wobei die Erkrankungen Hautkrankheiten sind, bei denen die Talgdrüsenfunktion eine Rolle spielt oder spielen kann.

Zusammenfassung

Es werden fetthaltige, talgproduzierende Zellen (Sebozyten) beschrieben. Insbesondere betrifft sie Talgdrüsenzellen und eine Talgdrüsenzelllinie mit der Eigenschaft, über viele Subkulturen hinweg weitergezüchtet zu werden. Die Sebozyten eignen sich hervorragend für nützliche Anwendungen.

1/8

FIG. 1a

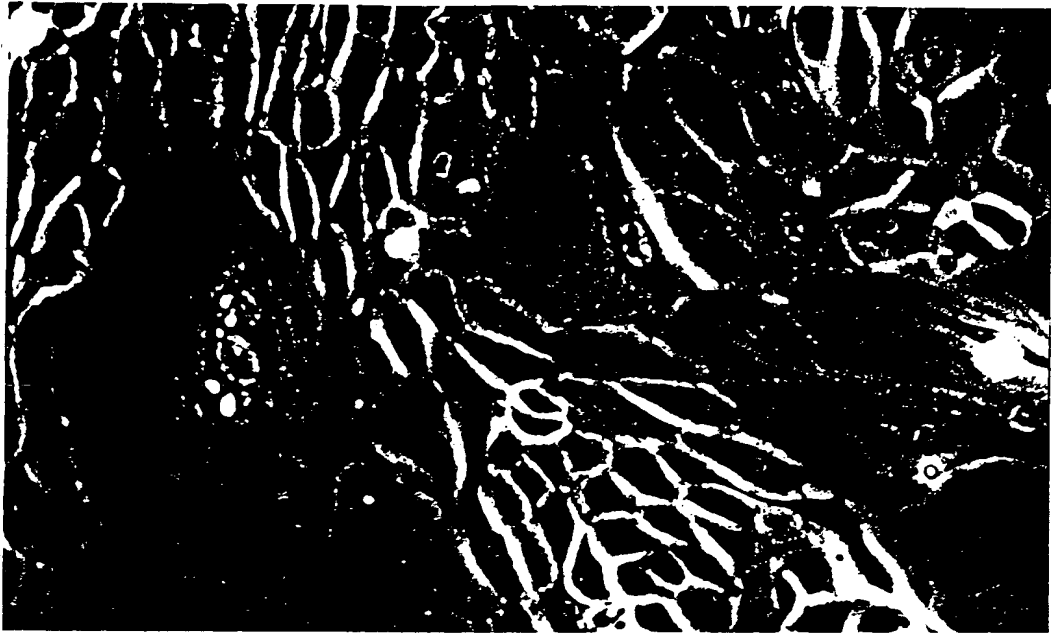
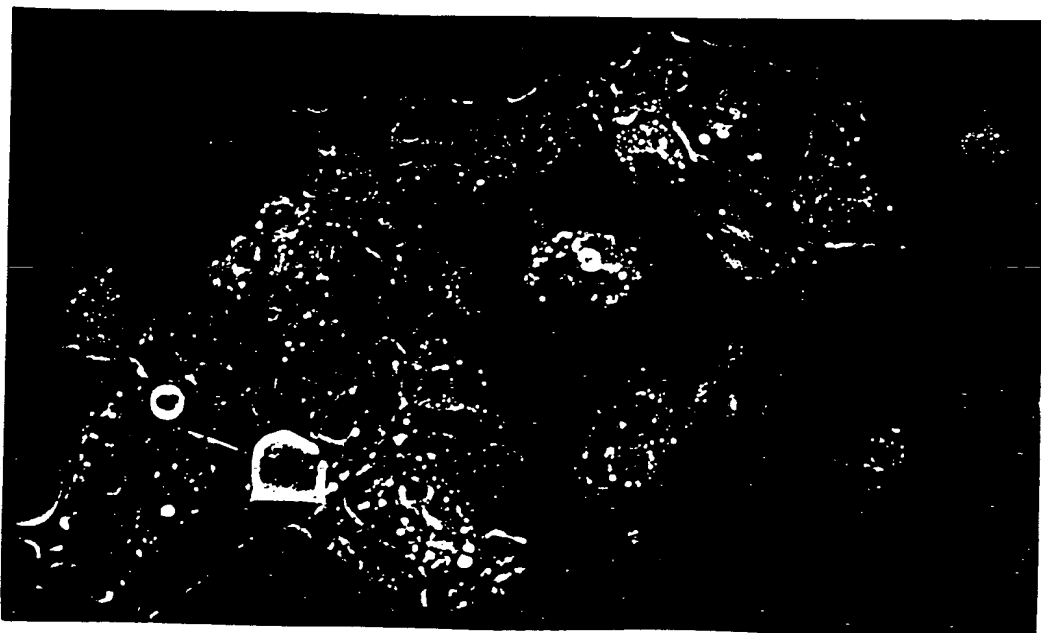


FIG. 1b



2/8

FIG. 1c

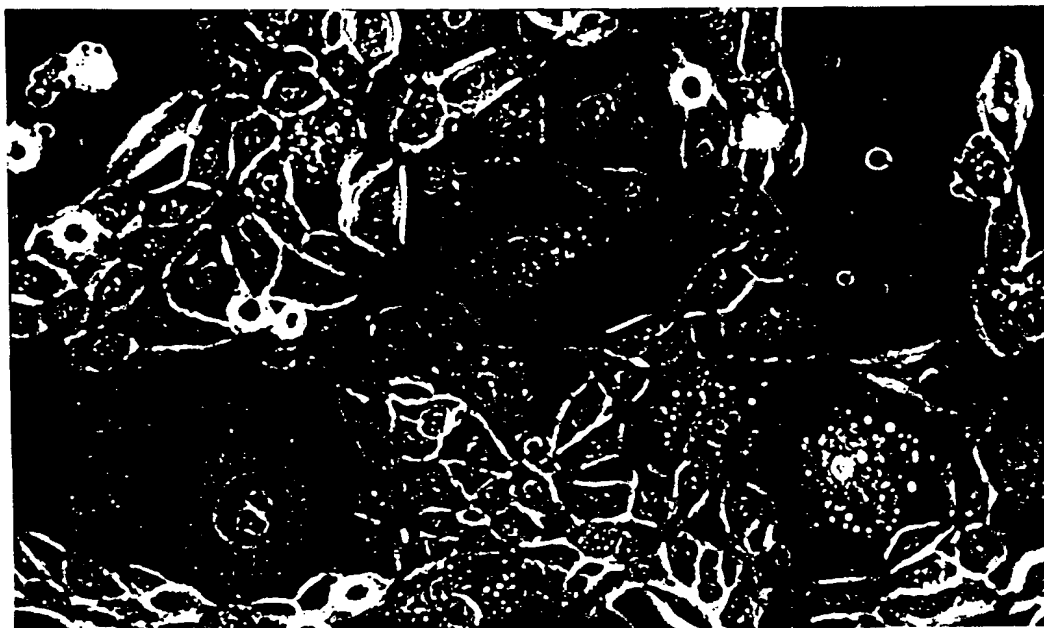
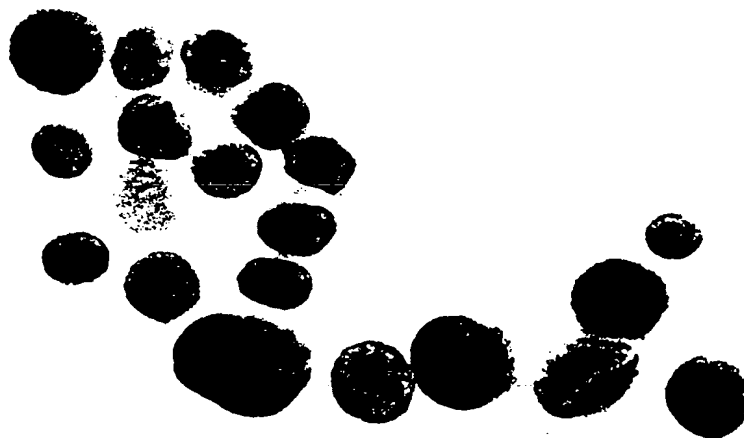


FIG. 2a



3/8

FIG. 2b

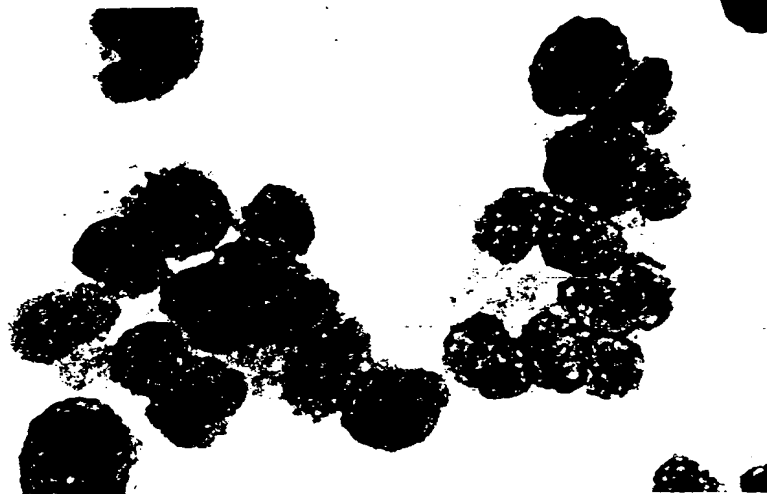


FIG. 2c

1 2 3 4 5 6



4/8

FIG. 3a

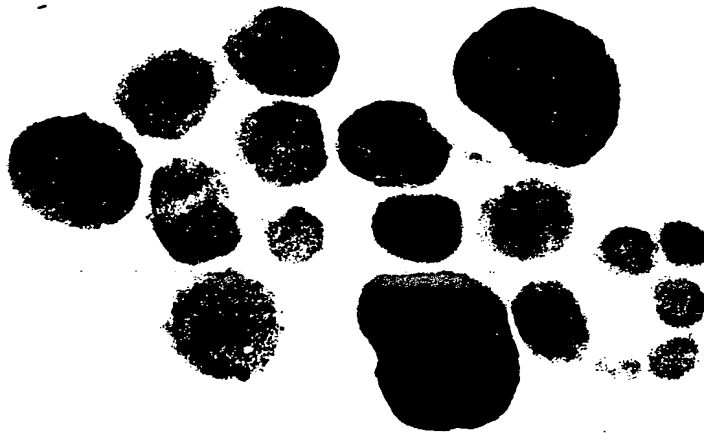


FIG. 3b

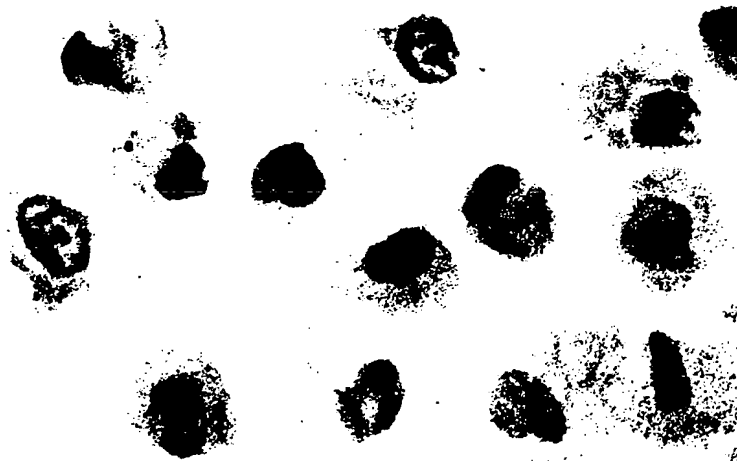


FIG. 4

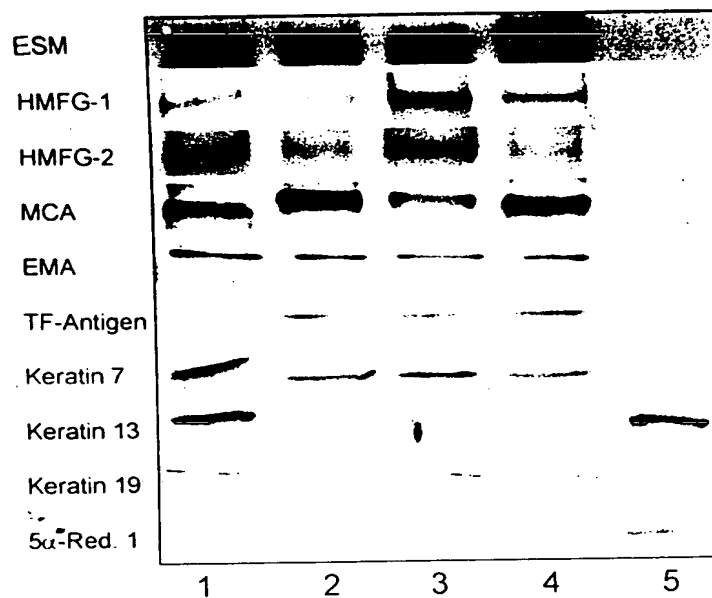


FIG. 5

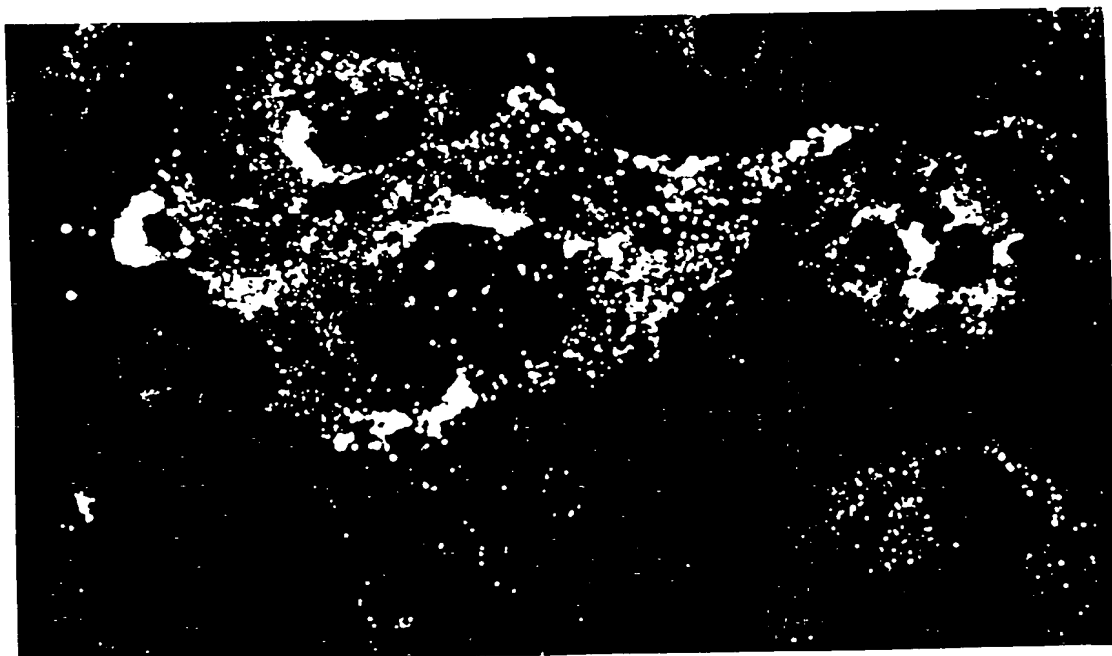


FIG. 6

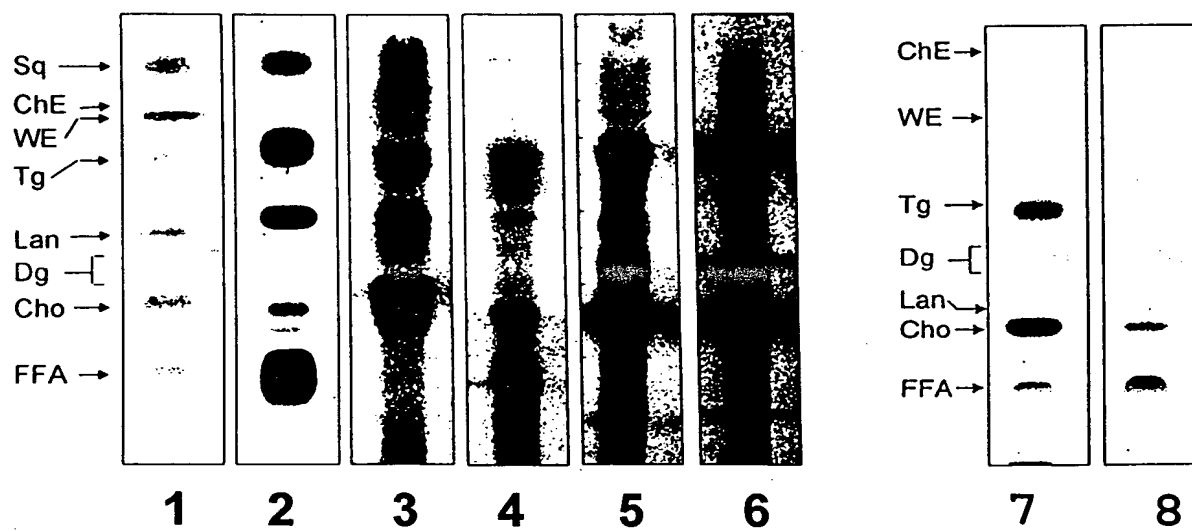


FIG. 7

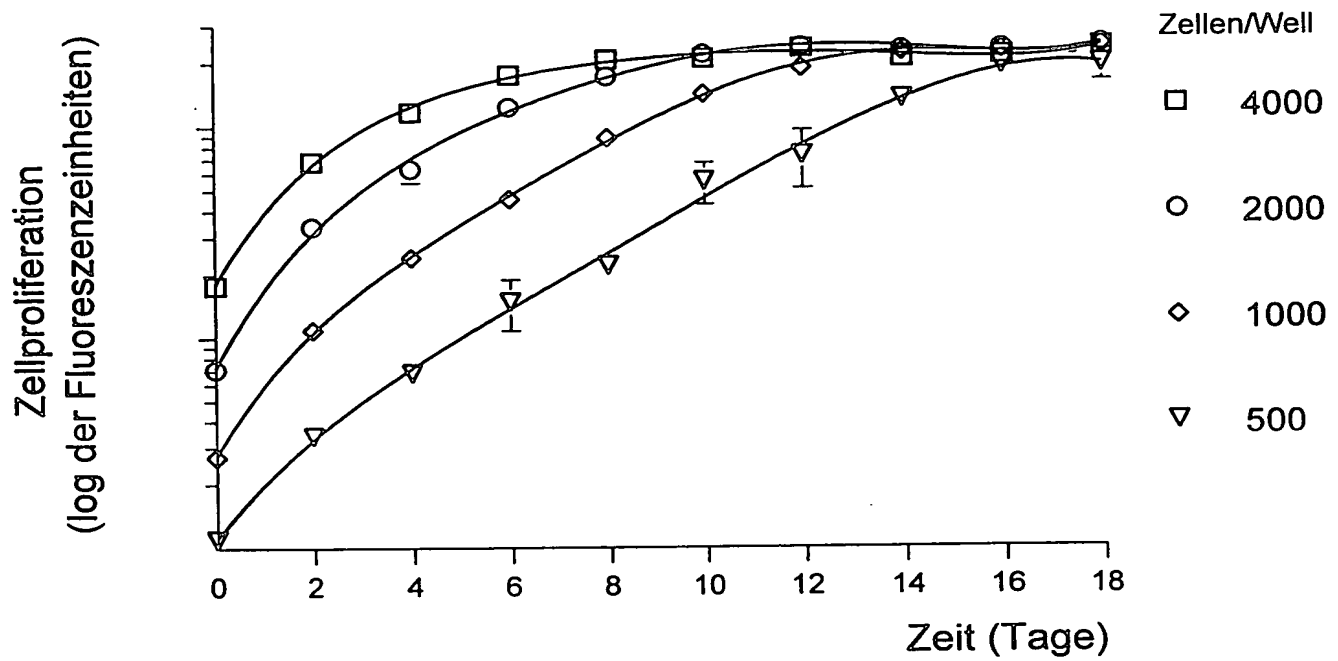


FIG. 8

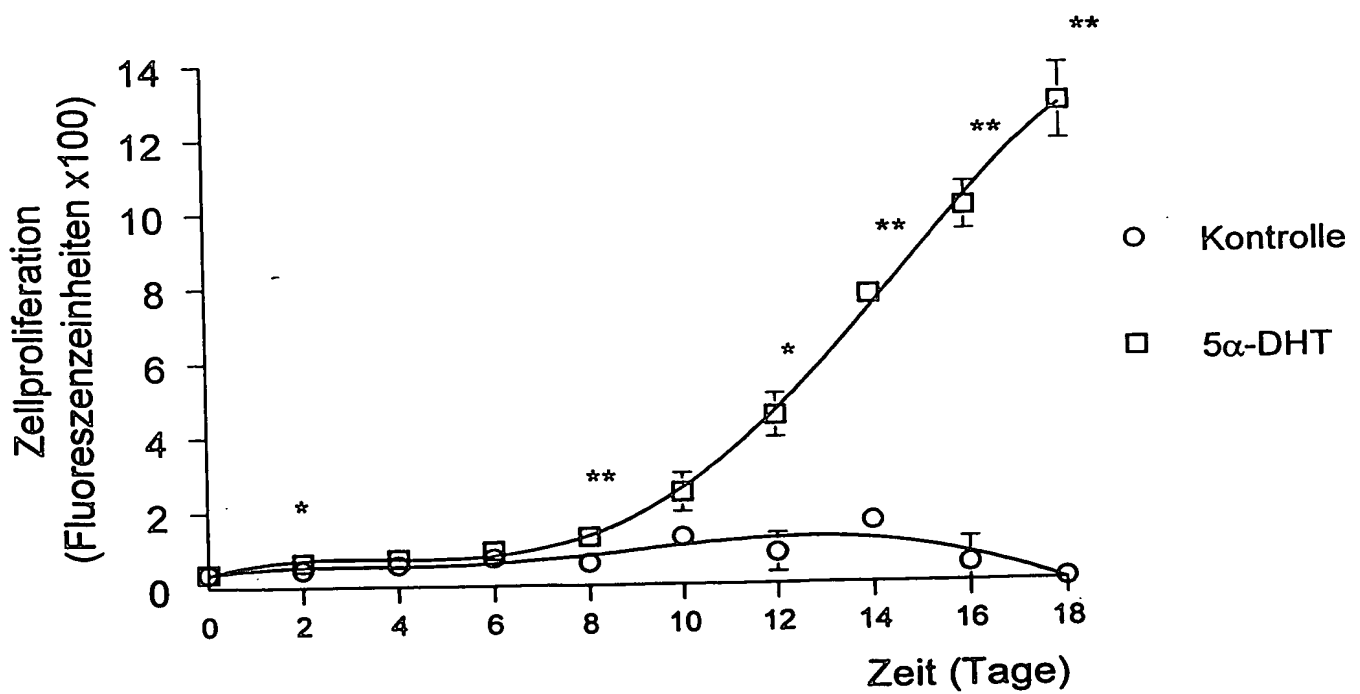
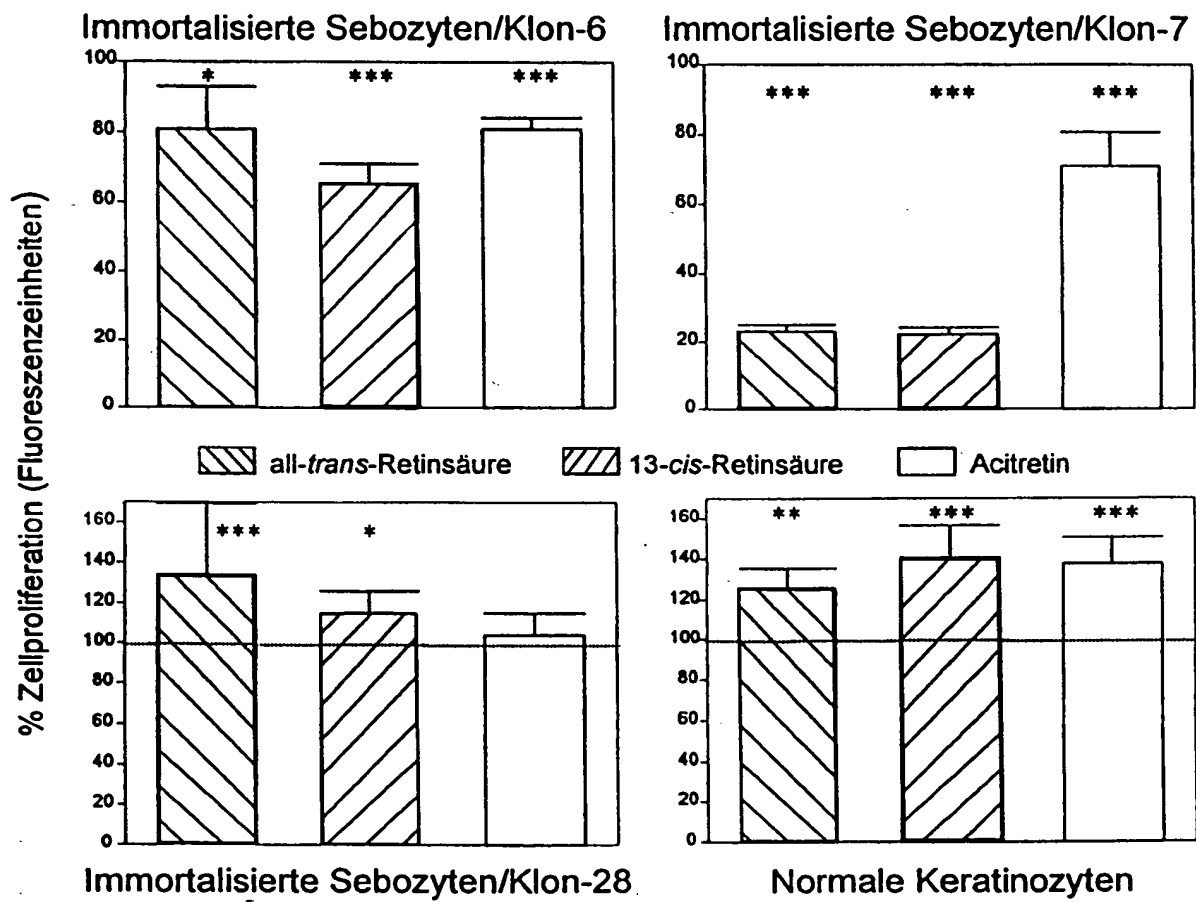
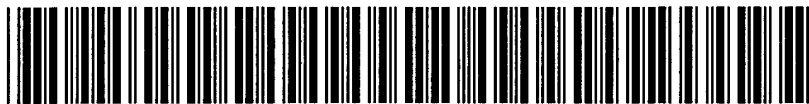


FIG. 9





Creation date: 11-20-2003
Indexing Officer: SCHASE1 - SUSAN CHASE
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 09920392

Legal Date: 05-07-2003

No.	Doccode	Number of pages
1	CTFR	6

Total number of pages: 6

Remarks:

Order of re-scan issued on